人工细胞的表型测试与分选：构建从光谱学到遗传学的桥梁

马 波 徐 健*

中国科学院青岛生物能源与过程研究所 单细胞中心 青岛 266101

摘要 近年来，基因组测序、编辑与合成技术日新月异，推动了基因型“设计”和“合成”能力的突飞猛进，同时也使人工细胞的表型检测成为合成生物学发展的瓶颈环节之一。对于细胞功能的快速测试与评价，单细胞分析技术具有重要意义与前景，但理想的解决方案需要具备活体无损、非标记式、提供全景式表型、能分辨复杂功能、快速高通量且低成本、能与组学分析联动等特征。以此为出发点，文章重点介绍了基于非标记式分子光谱学的单细胞功能表征、分选与组学技术体系的进展，并讨论了该领域的关键问题与发展方向。多种光谱技术之间扬长避短的运用与多模态成像，结合高通量的光谱激活细胞分选技术及下游单细胞组学技术，正构建与拓展着一条连接光谱学与遗传学的广阔桥梁。这一桥梁不仅为细胞工厂的高通量、全景式表型检测与筛选提供全新的解决方案，还将推动“单细胞精度的光谱表型组-功能基因组”作为一种新的生物大数据类型，服务于“数据科学”驱动下的合成生物技术。

关键词 合成生物学，表型测试，分子光谱，光谱激活细胞分选，单细胞表型组，单细胞功能基因组

DOI 10.16418/j.issn.1000-3045.2018.11.007

合成生物学的核心使命是在阐明并模拟生物合成基本规律的基础之上，人工设计并构建新的、具有特定生理功能的生物系统，从而建立药物、功能材料或能源替代品等的生物制造途径[1]。其技术的跨越式发展，取决于“基因型设计”“基因型合成”与“细胞表型测试”这三大共性技术环节（design-build-test）的突破[2]。近年来，随着基因组测序与合成在通量与成本上的大幅度改进，以及基因组编辑技术的广泛应用，业界设计和构建突变体甚至人工细胞的能力已经突飞猛进[3-6]。然而，细胞表型测试速度与通量的发展却缓慢得多，有时候甚至落后几个数量级。例如，从基因型突变体库来筛选目标表型组合的细胞通常需要花费大量的人力、经费和时间（生产抗疟药前体的微生物细胞工厂的筛选约动用了150人年的工作量[7,8]）。因此，细胞表型测试已经成

* 通讯作者

资助项目：国家重大科研仪器研制项目（31827801），中国科学院科研仪器设备研制项目（YJKYYQ20170017），国家杰出青年基金（31425002）
修改稿收到日期：2018年10月29日

为合成生物技术发展的“限速步骤”之一。

1 人工细胞表型测试技术的现状

1.1 基于光谱的单细胞表型测试

无论是从天然环境中寻找、识别和鉴定生物元件与模块，还是表征、理解和筛选人工设计的基因回路与网络，关键环节之一均是其活性以及功能在活体细胞内的快速测试与评价。单个细胞是地球上生命的基本单元和进化的基本单位，因此，单细胞分析技术，即在单个细胞精度上的功能识别与表征，能够在最“深”的水平挖掘生命元件、刻画细胞功能与理解生命过程。同时，单细胞分析不依赖于细胞培养而直接分析每个细胞个体的功能，因此能够克服环境中大部分微生物细胞尚难培养这一挑战，这对于从人体与环境微生物组中挖掘生物元件、模块或底盘细胞具有重大的意义。

1.1.1 单细胞检测分析技术的特征

对于细胞功能的快速测试与评价而言，理想的单细胞分析技术需要具备 6 个特征：① 活体检测。在很多情况下，元件与模块的功能，只有在活体细胞中进行非侵入式（即对细胞状态的扰动最小化）的测量与探究才具有生物学意义。同时，活体检测意味着，经检测后的细胞可直接进行后续培养或其他操作。② 不需标记。如前所述，从天然元件的挖掘角度讲，自然界中微生物细胞具极大遗传多样性，并且通常尚难以培养，因此目前尚无对复杂微生物组中的细胞类型广谱适用的细胞标记手段。从基于大肠杆菌、酵母等底盘细胞的基因功能筛选角度讲，与潜在需要测量的细胞功能相比，能够利用荧光探针等对细胞进行标记的表型与功能仍极为有限。因此，非标记式的细胞检测具有重要优势。③ 提供全景式的表型信息。研究人员感兴趣的许多细胞功能是由多个表型共同反映或决定的，如果只测量单一的表型或单个化合物、蛋白、基因的表征，往往难以探测目标功能，而同时能提供多种表型乃至测量表型组的“全景式”分析则具有重要的优势。④ 能分辨复杂功能。许多重要甚至核心的细胞功能由多个基因共同反映或决定，因此针对单一蛋白或化合物分子的检测经常难以分辨与识别这类功能。⑤ 快速、高通量与低成本。平板上的一个菌落中可包括10^9个细胞，因此单细胞精度的表型分析对于速度、通量和成本提出了比单菌落层面更高的要求。⑥ 与单细胞功能基因组分析联动。单细胞精度的基因组、转录组、蛋白质、代谢组、表观组等是生命科学方法学研究前沿进展最迅速的领域之一[9]。如果能够通过细胞分选，将单细胞表型或表型组的分析与这些单细胞功能基因组手段直接对接，将能够在真正意义上建立单细胞精度的“表型-基因型”模型，从而带来细胞个体、细胞群体乃至细胞群落层面合成生物学的突破。

1.1.2 单细胞光谱检测技术的类型

代谢物是细胞中基因表达的最终产物，也通常是细胞表型与功能的最直接载体，因此代谢物组的检测，包括代谢状态的识别，是细胞功能检测最直接、最有效的手段之一[10]。目前在人工细胞测试的流程中，通常用气相色谱-质谱联用仪（GC-MS）、液相色谱-质谱联用仪（HPLC-MS）或核磁共振（NMR）对细胞“群体”或“群落”进行系统分析，从而实现细胞功能的检测[11]。但是单个细胞尤其是单个微生物细胞的代谢物极为微量，而且难以像核酸那样进行扩增，因此，受到现有质谱、色谱与核磁检测灵敏度的限制，单细胞代谢组分析目前仍然存在困难[12]。此外，这些方法的前提通常是裂解细胞以提取或制备胞内代谢物，因此难以和目标单细胞的后继培养或基因组与转录组分析直接对接。而单细胞光谱则是在特定时间、空间与状态下针对一个单细胞采集的分子光谱，能够体现与展示胞内代谢物（组）的特征，而且测量过程可以是非侵入性、非破坏性乃至维持活体状态，故通过光谱激活的细胞分选能够将特定光谱的细胞分离出来，进而与单细胞培养和各种破坏性的单细胞功能基因组分析直接对接。因此，单细胞光谱技术是克服上述挑战的有效手段。

（1）基于荧光光谱的细胞功能检测。荧光光谱具有

灵敏度高、特异性好、分析通量高等优势，是目前应用最为广泛的单细胞表型检测技术之一[13]。然而大多数细胞均没有自荧光，通常需要设计荧光探针，对细胞进行荧光标记。常用的细胞荧光探针包括小分子荧光染料和荧光蛋白等。部分小分子荧光染料能穿透细胞膜进入细胞内部直接标记目标分子，如小分子酶荧光探针可对细胞内的酶进行检测和成像[14]。此外，小分子荧光探针也可通过连接抗体，特异性地标记细胞表面抗原，从而实现细胞功能检测。荧光蛋白（如绿色荧光蛋白）是另一类重要的荧光探针，常作为报告基因与目标基因进行融合表达，以检测目标基因在细胞中的表达情况，从而刻画基因表达的动态过程及其功能异质性。荧光蛋白也可检测细胞内代谢小分子。例如，一系列特异性检测评价辅酶 NADPH 的高性能遗传编码荧光探针 iNap，实现了在活体动物、活细胞及各种亚细胞结构中对 NADPH 代谢的高时空分辨检测与成像[15,16]；可基因编码的多巴胺荧光探针和新型乙酰胆碱荧光探针，能在果蝇、斑马鱼和小鼠中检测内源多巴胺和乙酰胆碱的动态变化[17,18]。目前，基于荧光探针的细胞功能检测已被广泛应用于基因的表达调控、蛋白质空间定位与转运、蛋白折叠、信号传导、蛋白酶活性分析、生物分子相互作用和细胞代谢动态过程检测等研究领域。尽管基于荧光光谱的细胞功能检测具备诸多优点，但是，需要预知生物标示物，需要对细胞进行标记甚至是遗传操作，以及通常只能同时检测少数标记分子等前提条件也从原理上限制了荧光检测在生物元件挖掘与细胞表型检测中的广泛应用。对于自然界中绝大部分的微生物细胞，其生物标识物经常未知，也没有普适性的细胞标记方法，因此荧光检测的细胞类型适用范围相对较窄。即使对于大肠杆菌、酵母等常见的底盘细胞，构成细胞表型组的大部分表型，如各种底物的代谢活性、代谢产物谱、环境应激性、细胞间互作等，通常也难以用一种通用的荧光标记的方法来直接测量，往往需要构建独立的细胞荧光传感器。而在细胞中导入基于荧光的胞内传感器，通常需要通过转录因子等的设计和改造，将特定代谢物含量等信息转换为细胞的荧光强度[19]；这种对细胞进行 DNA 转化乃至遗传操作的前提，限制了适用的细胞类型与应用场景。尤其重要的是，出色的靶标分子特异性与多靶标同时检测可能是相互排斥的，由于多色荧光之间的相互干扰，目前多个基因功能表型的同时检测还无法广泛应用[20]，难以实现针对表型组的“全景式”测量。

（2）基于拉曼光谱的细胞功能检测。拉曼光谱是一种非标记的散射光谱，是分子键被激发到虚能态却尚未恢复到原始态所引起的入射光被散射后频率发生变化的现象[21]。每个单细胞拉曼光谱由分别对应于一类化学键的超过 1 500 个拉曼谱峰组成，反映了特定细胞内化学物质的成分及含量的多维信息。代谢物组成能够对细胞生理状态、细胞所处的环境变化，以及遗传背景做出快速响应，所以每个单细胞拉曼光谱可以被视为一张超过 1 500 个“像素”的高分辨率“照片”，用于表征单个细胞的状态、表型与功能。一个单细胞拉曼光谱中的每个拉曼谱峰或若干拉曼谱峰的组合均潜在代表一种表型。因此，正如一张肖像照能够同时展示人脸的诸多特征一样，单细胞拉曼光谱能潜在同时刻画与反映细胞的多种表型，实现全景式的表型分析[22]。除此之外，水分子没有很强的拉曼信号，不会对细胞的拉曼检测产生干扰。因此，可在细胞的最佳生理状态下进行拉曼成像，这使得拉曼光谱用于表征生命体系的应用范围十分广泛。

对细胞群体而言，在单细胞精度上准确描述群体细胞的功能表型及其异质性至关重要，拉曼组技术便能满足这一需求。所谓拉曼组是指在特定条件和时间点下随机取样的单细胞拉曼光谱的集合，在概念上类似于给细胞的群体（ramanome）或群落（meta-ramanome）拍“集体照”[22]。拉曼组相当于单细胞精度，可快速、低成本测定与监控的“代谢物组”，其变化可反映和表征该细胞体系全景式、几近无限的“状态”与“功能”。例如，拉曼组可以检测底物代谢活性[23,24]、测定产物含量[25,26]、表征环

境应激性(如细胞应激状态[27]、药敏性与耐药性[28,29]等）、细胞间代谢互作[30]等。这些特色充分体现了拉曼组手段与转录组、蛋白组、代谢组等手段的互补性，使其有望成为一种通用手段和崭新的表型组学数据类型，用以定义、表征乃至监测细胞的功能及其异质性。

（3）基于红外光谱的细胞功能检测。红外成像通常采用近红外区多色光作为激发光源，激发样品中分子能级跃迁，进而检测其红外吸收光谱。从 20 世纪 90 年代起，红外光谱便开始用于区分正常和癌变的组织[31,32]。虽然红外显微光谱技术理论上分辨率可达衍射极限，但是目前绝大多数红外显微光谱仪配备的都是传统的碳硅棒（globar）光源，其热源温度仅 1 000—1 500 K，光源亮度较弱，因此当测试狭缝调节到小于 10 μm（细胞尺寸相当）时，其光通量将明显降低，严重影响单细胞红外光谱的灵敏度。因此目前显微红外光谱大多只能对细胞中色素等红外吸收高的成分成像，如对雨生红球藻细胞中类胡萝卜素的空间分布和含量进行红外成像[33,34]。

同步辐射作为一种新型的红外光源，具有光谱宽（10—10 000 cm）、亮度高（比传统光源高 2—3 个数量级）、发散度小以及具有时间结构等优良特性。特别是其高亮度的特性十分适合开展单细胞显微红外光谱成像研究[35]。不仅可直接获得细胞内的生物化学信息，还可鉴别和检测特殊的细胞表型，并且具有亚细胞成像分辨能力。与普通红外光谱相比，同步辐射红外光谱在单细胞表型检测上具有更强大的功能。然而在细胞红外光谱成像过程中，为了保持细胞的活性，测试往往需要在水溶液中进行的。但是，水分子在 3 000—3 750 cm^{-1} 与 1 600—1 700 cm^{-1} 光谱处都存在明显的红外吸收，故克服这一干扰是细胞红外成像的关键。微流控芯片技术能精准地操控流体，其微通道可准确控制细胞外水层的厚度，从而最大限度地消除水环境对细胞红外光谱的干扰。一系列适合细胞红外光谱成像的微流控芯片装置的出现，为高通量单细胞红外成像奠定了平台基础[32,36]。

（4）基于太赫兹光谱的细胞功能检测。太赫兹（THz）位于电磁波谱的微波和红外区域之间，其频率范围为 0.3—3×10^{12} Hz，探测细胞内部时不受散射限制，因此具有出色的生物组织穿透能力，为原位乃至在体的细胞表型测量带来了希望。一种耦合腔谐振器系统能在 10 GHz 频率下快速测量流动的细胞，实现了流动状态下小鼠成肌细胞的太赫兹光谱测量[37]。太赫兹光谱测量信号与细胞的体积直接相关，故为细胞大小分布提供了一种快速准确的测量方法，其潜在的应用包括检测血液样本中循环肿瘤细胞（一般比白细胞大）等。虽然太赫兹光谱成像在细胞原位或在体分析上具有重要潜力，但就已发表的工作来看，能检测的细胞表型仍然较少也相对局限，距离现实应用尚有距离。

1.2 基于光谱的单细胞表型分选

在基于各种光谱技术的单细胞功能识别与表征基础之上，利用光谱激活的细胞分选技术，能够分离出特定功能的单细胞，进而测定与该功能相对应的基因型，甚至是转录组、蛋白组、代谢组、表观组等单细胞功能基因组，从而在单个细胞精度上建立“表型-基因型”关联。

1.2.1 荧光激活细胞分选

长期以来，荧光流式分选作为一种主流的细胞分析和分选技术得到了广泛应用。商品化荧光流式细胞分选仪（fluorescence-activated cell sorting，FACS）的检测和分选通量可达数万个细胞/秒，自动化和智能化程度较高，但是仪器成本却一直居高不下，成为应用推广的重要障碍。近年来由于微流控技术的引入，FACS 的成本大幅降低，同时还带来了灵活、精确等优点。基于微流控的 FACS 通过采用表面驻波声波三维细胞聚集技术，使得细胞可在低夹流流速条件下实现精确聚焦，可避免细胞在传统 FACS 中由于高流速、高剪切力带来的损伤[38]。

近年发展起来的基于液滴微流控的荧光激活液滴分选（fluorescence-activated droplet sorting，FADS）技术由于采用液滴包裹细胞，解决了传统 FACS 难以解决的细胞分泌蛋白或者胞外代谢小分子检测这一难题，分选通量

也可达到30 kHz[39,40]。经过表型检测分选后，单个细胞仍被包裹在单个液滴中，保持独立性，并能与下游单细胞培养、测序等组学研究无缝衔接。基于FADS平台，实现了哺乳动物细胞U937对药物库的毒性表型检测分选[41]，从定向进化的酵母突变体库中（数量约为10^8个突变子）检测筛选具有高辣根过氧化物酶活性的突变体[42]等。也有报道在FADS平台上集成双通道检测系统，从定向进化的突变体库（约10^7个突变子）中筛选到优先生产布洛芬对映异构体的高对应选择性的酯酶[43]。最近，通过耦合FACS和人工智能技术，在基于高通量高分辨度图像处理的单细胞表型检测分选平台（intelligent image-activated cell sorting，IACS）上，示范了衣藻突变体库的多参数智能化筛选[44]。概言之，FACS加速了合成生物学"检测"的环节，使之得以匹配"设计"和"合成"的通量，促进了合成生物学的发展。但如前所述，由于受制于FACS需要荧光探针和标记细胞，同时检测的表型数目很有限等原理上的局限，亟须发展基于非标记式光谱识别、全景式表型分析、广谱适用于自然界所有细胞的细胞分选技术。

1.2.2 拉曼激活细胞分选

如前所述，拉曼光谱是一种无损非标记的单细胞表型识别手段，在基于微生物组或工程细胞库的细胞功能筛选中均具有广阔的应用前期[22]。如何在拉曼识别后高通量地分选目标表型细胞，即拉曼激活细胞分选（Raman-activated cell sorting，RACS）[45,46]，并用于下游培养、组学分析等环节，对于细胞表型测试平台的构建同样重要。近年来，一系列基于拉曼光谱的单细胞分选技术和核心器件先后面世，其中包括拉曼光镊分选[47-50]、拉曼弹射分选（RACE）[23]、拉曼光钳液滴分选（RAGE）、拉曼微流分选（RAMS）[51,52]、拉曼微流液滴分选（RADS）[53]等。这些新工具有效耦合了单细胞拉曼表型测量和基因型分析（或培养），为在单细胞水平解析表型和基因型的关系提供了重要手段。

拉曼激活弹射分选（RACE）[23]，其基本原理是在拉曼测量基片上溅射一层薄膜，将样品点在该薄膜上并封装接收微孔阵列；对细胞进行拉曼检测后，特定细胞可通过施加一束脉冲激光在目标细胞位置的基体芯片上；该细胞将被弹射剥离到收集微孔内，可灵活实现单个微孔内收集单个细胞或多个细胞。受光斑尺寸的影响，直接弹射一般用于小细胞的弹射分离，针对大细胞及细胞团，可对目标细胞区域先进行激光切割（RAMD），然后进行弹射。该方法操作相对灵活简单，分选准确率高。然而，拉曼分析分选时的激光辐射对细胞的生理活性会造成一定损伤[54]，而在RACE的干片模式下，导热散热较为困难，辐射造成的细胞活性损伤有可能更为显著。此外，由于激光辐射引起胞内核酸损伤等可能原因，弹射后细菌单细胞测序的覆盖度一般不超过20%，因此基因组拼装相对困难[23,55]。

拉曼激活光镊液滴分选（RAGE），是笔者团队新近开发的一种耦合拉曼光镊和液滴单细胞包裹导出的拉曼细胞分选技术。RAGE克服了单一光镊力难以实现目标细胞脱离焦平面导出的问题，通过耦合液滴微流控技术，完成了目标单细胞的精准分选和快速导出。同时，拉曼检测于水相中进行，能最大限度地保持细胞生理活性，并能够精确匹配每个细胞与之相对应的拉曼光谱表型，实现"所测即所得"。此外，分选后的单细胞已经包裹在油包水微液滴中，因此可直接耦合后续的单细胞培养和组学分析。我们的数据表明，细菌细胞通过RAGE系统分选之后其存活率基本不受影响，可直接耦合下游的单细胞培养。而在与RAGE直接耦合的单细胞核酸扩增与测序中，可能是由于液相拉曼检测对于目标细胞的保护作用，目标大肠杆菌单细胞的全基因组测序覆盖率有了大幅度提高（可达约95%）。

前两种拉曼细胞分选技术均是在细胞静止或相对静止状态下完成，其通量尚无法满足高通量的细胞表型功能分选需求。发展流式拉曼单细胞分选技术是必然趋势，但受限于拉曼信号弱这一先天性缺点，首先需要解决高速流动状态下细胞拉曼采集这一瓶颈问题。我们开

发了一种基于介电单细胞捕获/释放的拉曼激活微流分选（RAMS）技术，解决了上述瓶颈，率先实现了拉曼流式细胞分选[51]。该RAMS系统集成了基于介电的单细胞捕获释放单元，可实现高速流动状态下单细胞的捕获，从而完成拉曼信号获取。在此基础上，我们进一步建立了拉曼激活液滴分选（RADS）技术，提高了拉曼细胞分选通量和系统的稳定性[53]。由于采用介电液滴分选技术，RADS系统是目前已报道工作中全谱分选通量最高的RACS系统，通量达数百个细胞每分钟，与此同时，针对雨生红球藻中虾青素含量的分选准确率达到95%以上，分选后细胞存活率达93%[53]。值得一提的是，目前该分选通量主要受限于拉曼检测而非系统本身，通过与高灵敏拉曼检测技术（如受激拉曼等）[56]耦合，可实现超高通量分选。

上述RACS技术家族的建立与拓展为人工细胞表型检测和筛选提供了新的、强有力的技术手段，也为目前FACS尚难于解决的应用提供了全新的解决方案[57]。但是仅凭上述单元技术尚无法直接满足人工细胞的表型筛选的现实需求，亟须针对合成生物技术的现实需求，构建基于上述单细胞拉曼分选关键技术的细胞筛选全流程和装备系统。

1.2.3 其他非标记式的细胞功能检测与分选方法

细胞表型与功能的差异，除体现于光谱性质的不同外，还可能导致细胞物理性质的变化。因此，通过单细胞物理参数的测量，也可识别与分选细胞表型。如单细胞电阻抗可反映细胞状态，与细胞大小、生长阶段等多种表型直接相关，已被用于分选人体正常细胞与肿瘤细胞[58]。同样，正常细胞和肿瘤细胞的单细胞力学参数有异，细胞形变能力等参数已展示出肿瘤诊断的潜力[59]。

上述基于细胞电阻抗、力学形变能力等物理性质也被已经应用于细胞功能分选。不同的单细胞操控力场如光镊力、电场力（介电场等）、声波（表面驻波）、流体力场、磁场等均可以方便地集成到微流控芯片系统中，从而实现高通量、高精准的单细胞功能分选[60]。总体而言，为了适应千变万化的细胞表型分选需求，基于新概念或新原理的单细胞功能分选技术不断涌现，并向着高信号特异性、高检测动态范围、非标记、全景式、高通量、人工智能化等目标方向不断推进[36,53,56,61]。

2 人工细胞表型测试方法学的瓶颈和发展方向

针对活体无损、非标记式、提供全景式表型、能分辨复杂功能、快速高通量且低成本、能与组学分析联动等挑战，单细胞光谱成像与分选具有重要的特色与优势。这一贯通光谱学与遗传学、连接单细胞表型组与单细胞功能基因组的桥梁，正在迅速延伸与拓宽。然而，其潜力的挖掘与实现还需要诸多方面的努力，同时也带来了巨大的机遇。

（1）基于光谱的单细胞表型组测量。一方面，多种荧光探针的并行或复合使用，能够拓展在单细胞中同时检测的靶标分子数目；但是，由于多色荧光之间的相互干扰，多个基因功能表型的同时检测仍然是重要挑战[22]。另一方面，尽管基于单细胞拉曼光谱的拉曼组能够在无需探针的前提下测量底物代谢活性、产物谱、环境应激等诸多表型，但是单细胞精度同时测量这些表型的“全景式”表型组分析尚需结合特定应用进行示范。同时，单细胞层面的表型测量不可避免地带有基因表达的随机性所引入的噪音，因此，这些噪音的定量和溯源，是从单细胞光谱表型推断细胞群体或群落层面的表型、乃至区分单细胞状态变化或基因型变化的关键。

（2）“靶标分子特异性”与“全景式表型测量”兼顾的单细胞光谱成像。基于荧光探针的设计实现靶标分子的高特异性检测是荧光光谱的特色，而拉曼光谱能够对自然界几乎任何细胞直接分析多种表型，两者之间的优势互补、耦合使用，并证明“靶标分子特异性”与“全景式表型测量”的兼容性，将大大拓展单细胞科学与单细胞技术的应用领域，是很有前景的研究方向。例如，新近提出的生物正交标记受激拉曼散射显微活细胞成像技术，基于炔基单一化学键标记的受激拉曼散射，

突破了成像标记基团的尺寸极限；而且炔基报告基团几乎没有拉曼背景干扰，即在拉曼光谱上"生物正交"。炔基代谢标记生物分子技术和受激拉曼显微成像技术的结合，实现了活细胞的脂类、核酸、蛋白质和糖类的特异性拉曼成像[62,63]。同时，荧光光谱和拉曼光谱的联用在肿瘤检测等方面已有一定应用[64]。此外，在单细胞水平，光谱参数与电学参数、力学参数等的并行测量与分选，将把单细胞表型组在合成生物学的应用推向新的维度，并在动物、植物、微生物等领域的高通量表型监测和分子育种等方面作出重要贡献[65-67]。在基于光谱的单细胞表型组方面，除了多模态检测与分选原理及核心器件的创新，人工智能与大数据技术也将发挥不可或缺的作用[44]。

（3）单细胞"成像—分选—测序—培养—大数据"全流程的标准化与装备化与智能化。首先，在一定程度上，对于拉曼、红外等非标记式光谱来说，单细胞光谱信号质量与细胞承受的激发光能量成正相关。因此，光谱采集可能对细胞及其核酸造成损伤，导致分选后单细胞培养成活率低、单细胞基因组扩增的效率低，同时也阻碍了光谱采集—分选流程通量的提高。虽然我们的前期数据表明，流式拉曼检测和微液滴包裹能激光照射后细胞的活性[53]并且提高拉曼分选后核酸扩增与测序的质量，然而如何在保证细胞活性与信号质量的同时，继续大幅度提高测量与分选的通量，这仍需要创新的解决方案。另一方面，单细胞拉曼、红外光谱的测量与分析的方法学还在不断优化中，其实验流程、计算分析以及数据等方面离标准化均还有相当距离。因此，迫切需要通过业界的合作，种细胞类型和应用场景来建立相应的光谱采集与分析技术与装备标准，为将来基于分子光谱的单细胞"表型组-基因组"大数据的大规模采集与共享奠定基础。

此外，单细胞光谱测试设备的原理各异，故适合测量的细胞类型与状态也不尽相同。例如，由于光合色素的存在，光合细胞往往需要一个"淬灭"过程才能测量拉曼全谱，有可能影响分析与分选的速度。因此，构建一套完全自动化的合成生物铸造平台，还需要考虑光谱检测原理与细胞性质之间、各种表型测试设备之间，以及基因型设计和合成等环节与细胞表型测试环节之间，在工作原理、操作过程和分析通量等方面的不同要求。在此基础上，借助大数据和云计算，一系列针对特定单细胞测试、分选、测序与培养需求的新型装备与技术服务网络将不断涌现，以支撑合成生物铸造平台的规模化与智能化。

3 结语

综上所述，基于光谱学的非侵入性单细胞功能表征技术任重而道远。多种光谱学之间扬长避短的联合作战，乃至光、电、声等多模态成像，结合高通量的光谱激活细胞分选技术及下游的单细胞组学技术，必将构建一条连接光谱学与遗传学的宽广桥梁，从而为细胞工厂的快速与自动化表征、筛选与机制解析提供新一代的解决方案。

同时，基于这一桥梁，单细胞光谱表型组及其相对应的单细胞基因组与转录组数据将逐渐积累。这一单细胞精度的"表型组-基因组"作为一种新的生物学大数据类型，将催生一系列崭新、共性、系统的实验仪器、计算工具乃至大数据网络，加速"数据科学驱动"的细胞工厂设计与构建，从而推动合成生物学研究思路与方法的改观。

因此，我们应当把握当前机遇，在国内外紧密合作的基础上，联合策划富有雄心、远见、创意与竞争力的单细胞表型组分析与分选方法学与装备研制计划，为合成生物学及其广阔的应用领域贡献一系列"中国制造"与"中国创造"的新方法、新工具和新仪器。

参考文献

1 Check E. Synthetic biology: designs on life. Nature, 2005, 438(7067): 417-418.

2 Auslander S, Auslander D, Fussenegger M. Synthetic biology-The synthesis of biology. Angewandte Chemie International Edition, 2017, 56(23): 6396-6419.

3 Kosuri S, Church G M. Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications. Nature Methods, 2014, 11(5): 499-507.

4 Gibson D G, Young L, Chuang R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nature Methods, 2009, 6(5): 343-345.

5 Sander J D, Joung J K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nature Biotechnology, 2014, 32(4): 347-355.

6 Brophy J A, Voigt C A. Principles of genetic circuit design. Nature Methods, 2014, 11(5): 508-520.

7 Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. Nature, 2006, 440(7086): 940-943.

8 Kwok R. Five hard truths for synthetic biology. Nature, 2010, 463(7279): 288-290.

9 Nawy T. Integrated single-cell profiles. Nature Methods, 2015, 13(1): 36.

10 Nielsen J, Oliver S. The next wave in metabolome analysis. Trends in Biotechnology, 2005, 23(11): 544-546.

11 Wishart D S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. Nature Reviews Drug Discovery, 2016, 15(7): 473-484.

12 Zenobi R. Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives. Science, 2013, 342(6163): 1243259.

13 Brehm-Stecher B F, Johnson E A. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68(3): 538-559.

14 Liu H, Chen L, Xu C, et al. Recent progresses in small-molecule enzymatic fluorescent probes for cancer imaging. Chemical Society Reviews, 2018, (47): 7140-7180.

15 Zhao Y, Yang Y. Profiling metabolic states with genetically encoded fluorescent biosensors for NADH. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 31: 86-92.

16 Tao R, Zhao Y, Chu H, et al. Genetically encoded fluorescent sensors reveal dynamic regulation of NADPH metabolism. Nature Methods, 2017, 14(7): 720-728.

17 Jing M, Zhang P, Wang G, et al. A genetically-encoded fluorescent acetylcholine indicator for *in vitro* and *in vivo* studies. Nature Biotechnology, 2018, 36(8): 726-737.

18 Sun F , Zeng J , Jing M, et al. A genetically-encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. Cell, 2018, 174(2): 481.

19 Wang T, Guan C, Guo J, et al. Pooled CRISPR interference screening enables genome-scale functional genomics study in bacteria with superior performance. Nature Communations, 2018, 9: 2475.

20 Nolan J P, Duggan E, Liu E, et al. Single cell analysis using surface enhanced Raman scattering (SERS) tags. Methods, 2012, 57(3): 272-279.

21 Raman C V, Krishnan K S. A new type of secondary radiation. Nature, 1928, 121: 501-502.

22 Xu J, Ma B, Su X, et al. Emerging trends for microbiome analysis: from sngle-cell functional imaging to microbiome big data. Engineering, 2017, 3(1): 66-70.

23 Jing X, Gou H, Gong Y, et al. Raman-activated cell sorting and metagenomic sequencing revealing carbon-fixing bacteria in the ocean. Environment Microbiology, 2018, 4: 29727057.

24 Berry D, Mader E, Lee T K, et al. Tracking heavy water (D_2O) incorporation for identifying and sorting active microbial cells. PNAS, 2015, 112(2): 194-203.

25 He Y, Zhang P, Huang S, et al. Label-free, simultaneous quantification of starch, protein and triacylglycerol in single microalgal cells. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 275.

26 Ji Y, He Y, Cui Y, et al. Raman spectroscopy provides a rapid,

non - invasive method for quantitation of starch in live, unicellular microalgae. Biotechnology Journal, 2014, 9(12): 1512-1518.

27 Wang T, Ji Y, Wang Y, et al. Quantitative dynamics of triacylglycerol accumulation in microalgae populations at single-cell resolution revealed by Raman microspectroscopy. Biotechnology Biofuels, 2014, 7: 58.

28 Teng L, Wang X, Wang X, et al, Label-free, rapid and quantitative phenotyping of stress response in *E. coli* via ramanome. Scientific Reports, 2016, 6: 34359.

29 Tao Y, Wang Y, Huang S, et al. Metabolic-activity-based assessment of antimicrobial effects by D_2O-labeled single-cell Raman microspectroscopy. Analytical Chemistry, 2017, 89(7): 4108-4115.

30 Wang Y, Song Y, Tao Y, et al. Reverse and multiple stable isotope probing to study bacterial metabolism and interactions at the single cell level. Analytical Chemistry, 2016, 88(19): 9443-9450.

31 Mattson E C, Aboualizadeh E, Barabas M E, et al. Opportunities for live cell FT-infrared imaging: macromolecule identification with 2D and 3D localization. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(11): 22753-22781.

32 Sabbatini S, Conti C, Orilisi G, et al. Infrared spectroscopy as a new tool for studying single living cells: Is there a niche. Biomedical Spectroscopy and Imaging, 2017, 6(3-4): 85-99.

33 Liu J, Huang Q. Screening of astaxanthin-hyperproducing Haematococcus pluvialis using Fourier Transform Infrared (FT-IR) and Raman microspectroscopy. Applied Spectroscopy, 2016, 70(10): 1639-1648.

34 Liu J, Song L, Huang Q. Rapid screening astaxanthin-hyperproducing Haematococcus pluvialis mutants through near infrared spectroscopy. Letters in Applied Microbiology, 2016, 62(2): 185-191.

35 Petibois C, Cestelli-Guidi M, Piccinini M, et al. Synchrotron radiation FTIR imaging in minutes: a first step towards real-time cell imaging. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 397(6): 2123-2129.

36 Vaccari L, Birarda G, Businaro L, et al. Infrared microspectroscopy of live cells in Microfluidic Devices (MD-IRMS): toward a powerful label-free cell-based assay. Analytical Chemistry, 2012, 84(11): 4768-4775.

37 Ma Z, Hanham S M, Arroyo Huidobro P, et al. Terahertz particle-in-liquid sensing with spoof surface plasmon polariton waveguides. APL Photonics, 2017, 2(11): 116102.

38 Ren L, Yang S, Zhang P, et al. Standing Surface Acoustic Wave (SSAW)- based fluorescence-activated cell sorter. Small, 2018, 14(40): e1801996.

39 Sciambi A, Abate A R. Accurate microfluidic sorting of droplets at 30 kHz. Lab on a Chip, 2015, 15(1): 47-51.

40 Qiao Y, Zhao X, Zhu J, et al. Fluorescence-activated droplet sorting of lipolytic microorganisms using a compact optical system. Lab on a Chip, 2017, 18(1): 190-196.

41 Brouzes E, Medkova M, Savenelli N, et al. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. PNAS, 2009, 106(34): 14195-14200.

42 Agresti J J, Antipov E, Abate A R, et al. Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. PNAS, 2010, 107(9): 4004-4009.

43 Ma F, Chung M T, Yao Y, et al. Efficient molecular evolution to generate enantioselective enzymes using a dual-channel microfluidic droplet screening platform. Nature Communations, 2018, 9(1): 1030.

44 Nitta N, Sugimura T, Isozaki A, et al. Intelligent image-activated cell sorting. Cell, 2018, 175(1): 266-276.

45 Song Y, Yin H, Huang W E. Raman activated cell sorting. Current Opinion in Chemical Biology, 2016, 33: 1-8.

46 Zhang Q, Zhang P, Gou H, et al. Towards high-throughput microfluidic Raman-activated cell sorting. Analyst, 2015, 140(18): 6163-6174.

47 Eriksson E, Enger J, Nordlander B, et al. A microfluidic

system in combination with optical tweezers for analyzing rapid and reversible cytological alterations in single cells upon environmental changes. Lab on a Chip, 2007, 7(1): 71-76.

48 Lau A Y, Lee L P, Chan J W. An integrated optofluidic platform for Raman-activated cell sorting. Lab on a Chip, 2008, 8(7): 1116-1120.

49 Xie C, Chen D, Li Y Q. Raman sorting and identification of single living micro-organisms with optical tweezers. Optics Letters, 2005, 30(14): 1800-1802.

50 Huang W E, Ward A D, Whiteley A S. Raman tweezers sorting of single microbial cells. Environmental Microbiology Reports, 2009, 1(1): 44-49.

51 Zhang P, Ren L, Zhang X, et al. Raman-activated cell sorting based on dielectrophoretic single-cell trap and release. Analytical Chemistry, 2015, 87(4): 2282-2289.

52 McIlvenna D, Huang W E, Davison P, et al. Continuous cell sorting in a flow based on single cell resonance Raman spectra. Lab on a Chip, 2016, 16(8): 1420-1429.

53 Wang X, Ren L, Su Y, et al. Raman-Activated Droplet Sorting (RADS) for label-free high-throughput screening of microalgal single-cells. Analytical Chemistry, 2017, 89(22): 12569-12577.

54 Yuan X, Song Y, Song Y, et al. Effect of laser irradiation on cell function and its implications in Raman Spectroscopy. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(8): e02508-17.

55 Song Y, Kaster A K, Vollmers J, et al. Single-cell genomics based on Raman sorting reveals novel carotenoid-containing bacteria in the Red Sea. Microbal Biotechnology, 2017, 10(1): 125-137.

56 Zhang C, Huang K C, Rajwa B, et al. Stimulated Raman scattering flow cytometry for label-free single-particle analysis. Optica, 2017, 4(1): 103-109.

57 Zhang Q, Zhang P, Gou H, et al. Towards high-throughput microfluidic Raman-activated cell sorting. Analyst, 2015, 140: 6163-6174.

58 Chawla K, Burgel S C, Schmidt G W, et al. Integrating impedance-based growth-rate monitoring into a microfluidic cell culture platform for live-cell microscopy. Microsystems & Nanoengineering, 2018, 4(1): 1-8.

59 Islam M, Brink H, Blanche S, et al. Microfluidic sorting of cells by viability based on differences in cell stiffness. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1997.

60 Shields C W 4th, Reyes C D, Lopez G P. Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation. Lab on a Chip, 2015, 15(5): 1230-1249.

61 Saeys Y, Gassen S V, Lambrecht B N. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. Nature Reviews Immunology, 2016, 16: 449-462.

62 Hong S, Chen T, Zhu Y. Live - cell stimulated Raman scattering imaging of alkyne - tagged biomolecules. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 53(23): 5827-5831.

63 Li S, Chen T, Wang Y, et al. Conjugated polymer with intrinsic alkyne units for synergistically enhanced Raman imaging in living cells. Angewandte Chemie International Edition, 2017, 56(43), 13455-13458.

64 Kong K, Rowlands C J, Varma S, et al. Diagnosis of tumors during tissue-conserving surgery with integrated autofluorescence and Raman scattering microscopy. PNAS, 2013, 110(38): 15189-15194.

65 郭庆华, 杨维才, 吴芳芳, 等. 高通量作物表型监测： 育种和精准农业发展的加速器. 中国科学院院刊, 2018, 33(9): 940-946.

66 Rozman J, Klingenspor M, Angelis M H. A review of standardized metabolic phenotyping of animal models. Mammalian Genome, 2014, 25(9-10): 497-507.

67 Bochner B R. Global phenotypic characterization of bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 2009, 33(1): 191-205.

Phenotyping and Sorting of Synthetic Cells: Building Bridge from Spectroscopy to Genetics

MA Bo XU Jian*

(Single-cell Center, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China)

Abstract In synthetic biology, the dazzling methodological innovations in sequencing, editing and synthesis of genomes have resulted in an unprecedented capability in "design and manufacturing of genotype". On the other hand, "testing of cellular phenotype and function" has increasingly become one major bottleneck. Single-cell technologies have tremendous implications and potentials in rapid testing of cellular function. However, ideally, such single-cell methods should allow non-invasive live-cell probing, be label-free, provide landscape-like phenotyping capability, distinguish complex functions, operate with high speed, sufficient throughput and low-cost, and finally, be able to couple with downstream omics analysis via cell sorting. In this perspective article, we focus on recent progress in label-free molecular spectroscopy-activated phenotyping, sorting and sequencing of single-cells, and discuss the key challenges and emerging trends of the area. We propose that alliance among the array of non-invasive spectroscopy methods or modes, when coupled with downstream high-throughput cell sorting and omics profiling, will establish and broaden a bridge that connects spectroscopy and genetics, in science, technologies, and communities. This bridge will lead to novel and creative solutions to high-throughput, landscape-like testing and screening of synthetic cells. Moreover, it will fulfill the promise of spectroscopy-enabled single-cell "phenome-genome" as a new type of biological big-data, and accelerate the pace of "data-driven" synthetic biology.

Keywords synthetic biology, phenotype test, molecular spectroscopy, cell sorting, single-cell phenome, single-cell functional genomics



马 波 中国科学院青岛生物能源与过程所单细胞中心微流控系统团队负责人，研究员。2008 年在中国科学院大连化学物理研究所微流控芯片实验室获分析化学专业博士学位。2008 年5月—2012年7月先后在美国加州大学洛杉矶分校 Crump 分子成像研究所和莱斯大学等研究机构从事博士后研究。2012 年加入中国科学院青岛生物能源与过程研究所。自 2003 年起致力于微流控芯片技术在分析化学和生命科学中的基础和应用研究。目前研究方向聚焦在：基于微流控高通量单细胞分析技术和仪器研究，以及工业酶、菌株和微藻的高通量筛选、选育和定向进化等。E-mail: mabo@qibebt.ac.cn

MA Bo Lead of Microfluidic Systems Group at Single-Cell Center, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess, Chinese Academy of Sciences (CAS-QIBEBT). He obtained Ph.D. in Analytical Chemistry from Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences in 2008. From 2008 to 2012, he worked as postdoctoral research associate in UCLA and then Rice University. In 2012, he joined CAS-QIBEBT as a full-time faculty member. His research interest focuses on microfluidics and lab-on-a-chip, in particular microfluidic-based high-throughput single cell sorting and genomics, POCT, etc. He has published over 20 peer-reviewed papers on *Analytical Chemistry*, *Lab on a Chip*, etc., and is listed on 20 patents or patent applications. E-mail: mabo@qibebt.ac.cn

*Corresponding author



徐 健 中国科学院青岛生物能源与过程研究所单细胞中心功能基因组团队负责人、单细胞中心主任，研究员。2003 年获美国圣路易斯华盛顿大学计算机硕士和生物化学博士，2004—2008 年任华盛顿大学基因组研究院基因组拼装与分析团队负责人，2008 年全职加入中国科学院青岛生物能源与过程研究所。主要通过开发工业微藻合成生物技术、拉曼组技术、微生物组数据科学工具、单细胞分析仪器系列等，服务于光合生物燃料、微生态健康、海洋监测、生物安全等应用领域。发表论文100余篇，被引用近8 000次。任*mSystems*高级编辑等。

E-mail: xujian@qibebt.ac.cn

XU Jian Lead of Functional Genomics Group and Director of Single-Cell Center, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess, Chinese Academy of Sciences (CAS-QIBEBT). He obtained M.S. in Computer Science and Ph.D. in Biochemistry in 2003 from Washington University in St Louis. From 2004 to 2008 he served as Team Lead of Genome Assembly and Analysis at Genome Institute and Research Instructor at Department of Genetics in Washington University. In 2008 he joined CAS-QIBEBT as a full-time faculty member. His research interest includes synthetic biology of industrial microalgae, ramanome technology, microbiome data science and single-cell analysis instrument series. He has published over 100 peer-reviewed papers on *Science*, *Cell Host Microbe*, *Nature Communications*, *Plant Cell*, etc, with nearly 8 000 citations. He is a senior editor of *mSystems*. E-mail: xujian@qibebt.ac.cn

■责任编辑：张帆